

*Zur stoffwechselhemmenden Wirkung
menschlichen Blutserums in der Gewebekultur
bei neoplastischen und entzündlichen Erkrankungen*

Karl Merker

1965

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER

ZUR STOFFWECHSELHEMMENDEN WIRKUNG
MENSCHLICHEN BLUTSERUMS
IN DER GEWEBEKULTUR
BEI NEOPLASTISCHEN
UND ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl-Friedrich Merker
aus Halle/Saale

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. H. WRBA
Korreferent:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 9.11.1965



INHALTSÜBERSICHT

EINLEITUNG	5
HAUPTTEIL	6
Material und Methode	6
1) Gewebezüchtung	8
2) Zusätzliche Verfahrensweisen	10
Versuchsergebnisse	13
Diskussion der Ergebnisse	20
ZUSAMMENFASSUNG	32
LITERATURVERZEICHNIS	33



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Frage nach dem Vorkommen spezifischer Faktoren im Blutserum tumortragender Individuen konnte bisher -trotz vielfältiger Bemühungen auf diesem Gebiet- nicht entschieden werden.

Der überwiegende Teil der entwickelten Testmethoden hat sich als nicht krebsspezifisch erwiesen. "Die meisten bisherigen Krebsreaktionen sind unspezifische Proben für Krebsfolgen, aber nicht für die Wesensfunktion der betreffenden Tumorform selbst. Sie fallen erst in fortgeschrittenen Stadien positiv aus und beweisen eigentlich nur Krankheit als solche." (zit. K.H.KAUER) (1).

Trotzdem ist die weitere Suche nach spezifisch veränderten Substanzen gerechtfertigt. Legt man zugrunde, dass die maligne Zellenentartung durch mutierte genetische Information in der Cytoplasmasythese verursacht wird, so lässt sich das Vorhandensein abartiger Proteine erwarten. Der Bence-Jones-Eiweisskörper des Plasmocytoms und die mannigfachen Paraproteine bei manchen Leukosen geben Hinweise, dass Krebszellen Proteine produzieren können, die vom normalen Körpereiwiss verschieden sind.

Neuerdings berichteten WRBA und RABES (2, 3), dass Blutserum von Ratten, die Impftumoren tragen, gegenüber gesunden Tieren der gleichen Art, den Stoffwechsel explantierter Organe hemmt. Der Nachweis wurde mittels Einbau von Radiophosphor ($^{32}_{15}\text{P}$) in die Zellen geführt. Die Erscheinung liess sich bei allen untersuchten Tumorarten wiederholen (Walker-Ascites-Carcinom, Yoshida-Sarkom, Yoshida-Ascites-Sarkom). Sie prägt sich bei fortschreitender Ausbreitung der Geschwülste zunehmend aus.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob bei den Spontankrebsen des Menschen eine ähnliche Wirkung nachweisbar ist. Im vergleichenden Ansatz wurde Blutserum von Krebskranken und von normalen Spendern, sowie von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen untersucht. Die Patienten waren bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme weder medikamentös (Cytostatica), noch radiologisch behandelt worden. Das Serum der Kontrollkulturen stammte von 20-30-jährigen gesunden Spendern.

MATERIAL UND METHODE

Die Untersuchungsmethode beruht darauf, dass dem flüssigen Nährmedium einer Gewebekultur zugesetztes, radioaktives Phosphat von den Zellen aufgenommen und organisch eingebaut wird. Das Isotop ist ein β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen. Der Grad seines Einbaues ist der Intensität der Phosphorylierungsprozesse in den Zellen proportional und liefert damit ein Mass für die Stoffwechselaktivität eines Gewebes *in vitro* (WRBA, H.) (4).

Die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in gleichartigen Organ-
teilchen (Explantaten) von bekanntem Gewicht wird bestimmt.

Die Durchführung der Versuche ist an sterile Bedingungen gebunden. Sämtliches Arbeitsgerät, das biologische Material und die verwendeten Salzlösungen müssen keimfrei gehalten werden. (Der Serumgehalt des Mediums stellt für Mikroorganismen einen idealen Nährboden dar. Sie konkurrieren mit den Explantaten in der Aufnahme von radioaktivem Phosphat, wodurch unbrauchbare Versuchsbedingungen entstehen.)

Für einen Versuch wurden jeweils 4 Kulturansätze vorbereitet, zwei davon mit Patientenserum und zwei mit Normalserum als Kontrolle. (In den Versuchsauswertungen werden die Mittelwerte aus den Messergebnissen zweier Kulturansätze aufgeführt.)

Die Medien setzten sich aus Salzlösung (Hank'sche Lösung) und Serum im Verhältnis 2 : 1 zusammen. Von weiteren Zusätzen an tierischen Eiweisskörpern (Embryonalextrakt) oder synthetischer Nährflüssigkeit (TCM) wurde abgesehen.

(TCM = Tissue-Culture-Medium nach MORGAN, MORTON und PARKER ist eine standardisierte Lösung verschiedener, chemisch definierter Verbindungen (Aminosäuren, Wachststoffe, Salze)). TCM und Embryonalextrakt werden in der Gewebezüchtung wegen ihres günstigen Einflusses auf das Zellwachstum, vielfach verwendet. Für die Untersuchung von menschlichem Serum hat es sich jedoch als vorteilhafter erwiesen auf derartige Zusätze zu verzichten.

Die erforderliche Gesamtmenge von Hank'scher Lösung (10 ml) wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben und das radioaktive Phosphat in gelöster Form zugesetzt. (Es wurde eine Menge zugegeben, die der Endkonzentration von $0,3 \mu\text{C}$ pro ml Medium entsprach. Hierzu war es notwendig, unter Berücksichtigung der Halbwertszeit, die jeweils vorhandene Aktivität pro ml Phosphatlösung bei Versuchsbeginn zu errechnen.) Je 2,5 ml der vorbehandelten Hank'schen Lösung wurden anschliessend in die bereitstehenden 4 Kultur-Röhrchen übertragen.

Von Patienten und gesundem Spender entnommenes Blut wurde, nach eingetretener Gerinnung, in verschliessbaren Röhrchen 10 min. bei 5000 U/min. zentrifugiert. Die Seren wurden immer frisch verwendet. Von

jeder Serumart wurden 3 ml abpipettiert und in Anteilen zu 1,5 ml auf die Kultur-Röhrchen verteilt.

Zur Gewinnung von Organexplantaten wurden aus embryonaler Rattenleber 96 würfelförmige Teilchen von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten. (Bei dieser Grösse besteht histologisch noch nach 48-stündiger Züchtung eine gleichmässig erhaltene Vitalität.) Die Leber entstammte Embryonen der Ratte zwischen dem 16. und 18. Schwangerschaftstag.

Je 24 Explantate wurden in einer Gruppe zusammengefasst und in ein zylindrisches Wägeschälchen mit 0,5 ml Hank'scher Lösung übertragen, dessen Gewicht vorher bestimmt worden war. Die Wägung wurde auf ein 1/10 mg genau vorgenommen (Mettlerwaage). Um Gewichtsverluste infolge Verdunstung der Wägelösung konstant zu halten, wurde jeweils in gleichen Zeitintervallen (5 min.) gewogen. Die ermittelten Gruppengewichte lagen zwischen 33 und 36 mg. Es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Explantatgruppen nicht mehr als 3 mg von einander abwichen. Die Voraussetzung, dass mit steigenden Gewichten der Einbau an markierter Substanz linear zunimmt, ist nur in engen Grenzen erfüllt. Explantate, die ein bestimmtes Gewichtsniveau überschreiten, nehmen relativ zu wenig Phosphat auf. Dies hängt mit den nutritiven Gegebenheiten in der Gewebekultur zusammen. Die Explantate werden durch Diffusion von der Oberfläche her ernährt. Die Vitalität der Zellen bleibt nur in einer Randschicht erhalten, deren Dicke konstant ist. Die Explantataktivität wächst deshalb proportional zur Oberfläche und nicht proportional zum Gewicht. Infolge der kubischen Form der Explantate nimmt die Oberfläche relativ langsamer zu als das Gewicht.

Die Explantate wurden gruppenweise, zusammen mit den 0,5 ml Wägelösung, in die bereitstehenden Medien eingebracht. Die benutzten Kultur-Röhrchen hatten einen Rauminhalt von 20 cm³, und waren luftdicht verschliessbar. Bei 4,5 ml Gesamtmediummenge stand somit ein Luftvolumen zur Verfügung, das während einer Züchtungsdauer von 20 Stunden bei weitem ausreicht, den O₂-Bedarf der Explantate zu decken.

Die Züchtung erfolgte bei 37 Grad im Rollerapparat. Damit ist es möglich, die eingebrachten Kulturröhrchen in Rotation um die eigene Achse zu versetzen. Die so erreichte Umwälzung der Medien steigert die physikalische Lösung von Sauerstoff. Ausserdem werden die Explantate gleichmässig suspendiert und in ihrem Stoffaustausch begünstigt. Nach 20 Stunden wurden die Kulturen entnommen. Die Explantate wurden vom Medium getrennt und in mehrmals erneuerter Hank'scher Lösung gewaschen. In Gruppen zu 4 Stück wurden sie auf Metallplättchen verteilt, getrocknet (1 Stunde bei 70°) und im Geigerzählrohr auf ihre Aktivität gemessen.

Der Quotient aus Impulssumme und Gewicht von 24 Explantaten eines Kulturansatzes ergibt einen vergleichbaren Wert (Imp/mg). Die Auswertung soll anhand eines Versuches erläutert werden, bei dem das Patienten-Serum gegenüber

Normalserum eine Hemmung des Explantatstoffwechsels bewirkt hat (siehe Tabelle Seite 8). Das Ergebnis zeigt in den Mittelwerten eine Aktivitätsdepression von $\approx 13\%$ beim Patienten-Serum. Die Abweichungen der Impulswerte innerhalb der gleichartigen Doppelansätze betragen $1,6\%$ und $2,5\%$. Dieser methodische Fehler liegt in allen folgenden Versuchen bei maximal $\pm 4\%$. Bei Vergleich verschiedener Einzelkulturen wären demnach alle Ergebnisse gesichert, die Werte $> 8\%$ erbringen. Durch Verwendung der Mittelwerte aus je 2 Kulturansätzen verringert sich die Fehlerwahrscheinlichkeit um 50% .

Beispiel einer Versuchsauswertung:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
	Pat.-Ser.	Pat.-Ser.	Norm.-Ser.	Norm.-Ser.
	2353	2365	2399	2562
	2416	2440	2520	2740
	2108	2482	2702	2239
	2179	2097	2570	2753
	2130	2020	2633	2155
	2181	2149	2432	2215
Impulssumme	13367	13553	15256	14664
- 6 x Leerwert ⁺	- 150	- 150	- 150	- 150
	<u>13217</u>	<u>13403</u>	<u>15106</u>	<u>14514</u>
/Gewicht (mg)	35,2	34,8	34,9	33,0
Impulse pro mg Explantatgewicht	375,5	385,1	432,8	439,8
Mittelwert	380,3		436,3	
In % entsprechen v. Norm.-Ser.	87,1		100	
% Hemmung gegenüber Normalserum:	12,9			

⁺ Als Leerwert wird die Zahl von Impulsen/min bezeichnet, die der Geigerzähler nach Einschaltung ohne Messobjekt registriert. Es handelt sich um die Radioaktivität der Luft und um Einflüsse der Höhenstrahlung. Zur Ermittlung der reinen Explantataktivität werden als Mittelwert 25 Impulse pro Einzelmessung abgezogen.

Die vorliegende Methodik diente nicht allein der Untersuchung nativer Seren. Sie wurde auch angewandt, um Seren zu prüfen, die vorher durch bestimmte Eingriffe verändert bzw. in ihrer Zusammensetzung variiert worden

waren. Dabei handelte es sich um Versuche, die im Rahmen der Diskussion der beobachteten Erscheinungen notwendig waren. Es erfolgte hier bei drei verschiedenen Gruppen von Versuchen eine spezielle Vorbehandlung der verwendeten Seren.

In der ersten Gruppe wurde aus dem Serumgesamteiweiss die Albuminfraction abgespalten und gesondert untersucht:

Zur Auftrennung der Serumproteine diente ein Elphor-VA-Gerät, das die Isolierung von Einzelfractionen auf Grund ihrer unterschiedlichen Ablenkung im elektrischen Feld ermöglicht. (Kontinuierliche Elektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG). Ein senkrecht zwischen zwei seitlichen Platinelektroden eingespannter Filtrierpapierbogen wird von einer darüber liegenden Wanne aus gleichmässig mit Pufferlösung durchströmt. Die Serumprobe wird mit Hilfe einer Dosierpumpe in feinem Strahl auf einen Punkt im oberen Drittel des Bogens kontinuierlich aufgetragen. Im vertikalen Strom der Pufferlösung werden die Proteine mitgenommen und gleichzeitig durch das horizontal angelegte elektrische Feld zur Anodenseite hin abgelenkt. Der Ablenkungswinkel bestimmt sich demnach aus dem Verhältnis zwischen der elektrophoretischen Beweglichkeit der Eiweisskörper und der Strömungsgeschwindigkeit des Transportmediums. Nach dem Durchwandern der Anordnung treten die einzelnen Fractionen an bestimmten Stellen des gezackten Unterrandes des Papierbogens aus und werden in vorgesetzten Röhrchen aufgefangen.

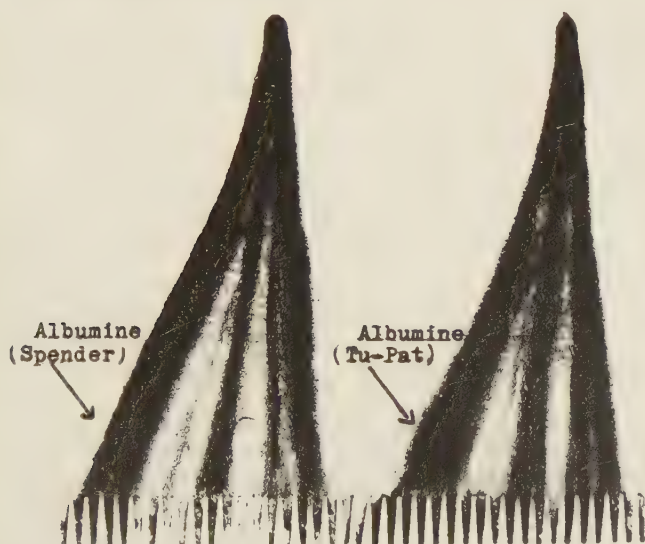


ABBILDUNG 1

Um während des Trennvorganges der Entwicklung von Keimen in den Seren vorzubeugen, war das Elphor-Gerät in einem Kühlraum bei konstant + 4 Grad Celsius untergebracht.

Die Auftrennung von jeweils 4 ml einer Serumprobe nahm 18 Stunden in Anspruch. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Feldstärke während dieser Zeitspanne war es wichtig, eine gleichmässige Konzentration der Ladungsträger auf dem Papierbogen sicherzustellen. Die Unterschiede im Elektrolytgehalt zwischen Serum und verwendeter Pufferlösung mussten deshalb vor Versuchsbeginn ausgeglichen werden. Hierzu wurde das Serum 6 Stunden in der Kälte gegen die Pufferlösung dialysiert. (Es handelte sich um einen Veronal-Na/Na-Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 8,5 und einer Ionenstärke von 0,04). Anschliessend erfolgte die Auftrennung bei 500 V Spannung und 15 mA Stromstärke. Tumorseum und Spenderserum wurden in einem Arbeitsgang getrennt. Durch Verwendung von zwei Dosierpumpen war es möglich, die beiden Serumarten nebeneinander auf den gleichen Trennbogen aufzutragen; - so konnten zeitliche Verschiebungen in der Gerinnung der Albuminfraktionen vermieden werden. Nach Beendigung des Trennvorganges wurden die erhaltenen Albumin-Puffergemische aus den Auffang-Röhrchen am Boden des Gerätes entnommen. Bezogen auf den durchschnittlichen Albumingehalt in 1 ml Serum (40 mg) lagen die gewonnenen Lösungen in 8-10-facher Verdünnung mit dem Puffer vor.

Im nächsten Schritt ging es darum, die Pufferbestandteile aus den Albuminlösungen zu entfernen. Die Gemische wurden in Dialysierschläuche eingebracht und in ein abdeckbares 20-Liter-Gefäss mit destilliertem Wasser eingehängt. Nach 24-stündiger Dialyse zeigten die Albuminlösungen neutrale Reaktion. Im Exsiccator wurden sie anschliessend auf 1/10 ihres Volumens eingeeengt.

Um Spender- und Patienten-Albumin in gleicher Konzentration der Gewebekultur zusetzen zu können, war es erforderlich, den Gehalt pro ml Lösung quantitativ zu bestimmen. Hierzu wurde eine colorimetrische Methode gewählt. Mit im Handel erhältlichem Rinderalbumin (als Trokensubstanz) erfolgte zunächst die Aufstellung einer Eichkurve: Auf der Mettler-Waage wurde Rinderalbumin in steigender Menge abgewogen (5, 10, 15 → 40 mg) und in jeweils 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Hiervon wurden mit einer Pipette je 0,1 ml entnommen, in Reagenzgläser gegeben und die Biuret-Reaktion angestellt. Die erhaltenen Farblösungen wurden im Eppendorf-Photometer gemessen. (Filter: 560 mμ). (Die einzelnen Werte sind aus dem Kurvenbild ersichtlich.) In gleicher Weise wurden nun je 0,1 ml der isolierten Albuminfraktionen colorimetriert und ihr Gehalt anhand der Eichkurve festgestellt. (Dieser schwankte zwischen 25-35 mg/ml). Anschliessend erfolgte die Angleichung der

Konzentrationen durch entsprechende Verdünnung der jeweils dichteren Lösung. Die gewonnenen Albuminlösungen konnten jetzt in der Gewebekultur untersucht werden. In der Menge von 1 ml wurden sie den Kulturmedien zugesetzt. Das weitere Vorgehen war, wie bei den obigen Versuchen mit Serum beschrieben.

In der weiteren Gruppe von Versuchen wurde das Serum-Gesamteiweiss in denaturierter Form verwendet:

Aus jeweils 1,5 ml Normalserum und Patienten-Serum wurden im Reagenzglas die Proteine mit der 4-fachen Menge absoluten Alkohols ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in keimfreiem Wasser gewaschen. Nach erneuter Abzentrifugierung wurde das Material in 2 ml Hank'scher Lösung suspendiert und anschliessend homogenisiert. (Hierzu dienten sterilisierbare Glasstempel-Homogenisatoren.) In Mengen zu je 1,5 ml wurden die Homogenisate den Kulturmedien zugesetzt.

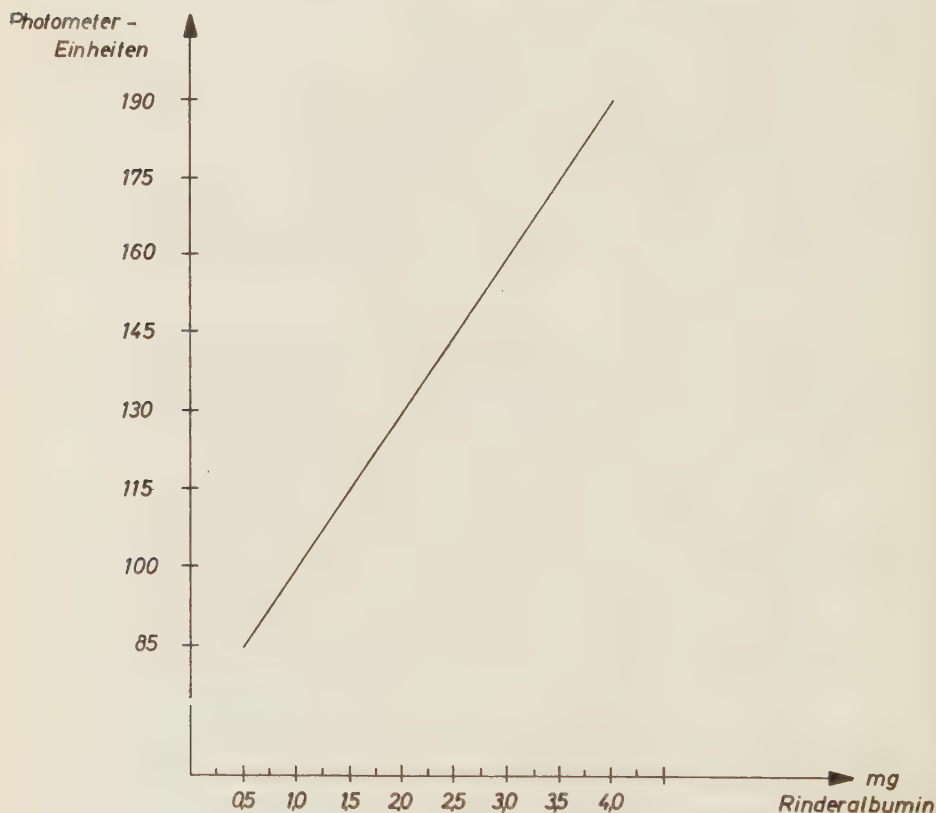
In einer dritten Gruppe von Versuchen wurde nach einer Methode gesucht, die es gestattet, im Serum enthaltene Fettstoffe zu entfernen, ohne dadurch dessen Eignung für Untersuchungen in der Gewebekultur zu beeinträchtigen. Dieses Ziel konnte nicht erreicht werden. Die eingeschlagenen Wege seien kurz dargestellt:

Als eine Möglichkeit, die die geringste Nebenwirkung auf die Proteinstrukturen versprach, wurde die Entfettung mit Äther versucht. Jeweils 3 ml Serum wurden mit der gleichen Menge Äther versetzt und umgeschüttelt. Nach Vertikalstellung des Reagenzglases bildete der leichtere Äther einen Überstand, der zusammen mit den darin gelösten Lipoiden abpipettiert wurde. Da Äther in der Gewebekultur stark toxische Eigenschaften hat, musste Wert darauf gelegt werden, ihn wieder vollständig aus den Seren zu entfernen. Die entfetteten Serumproben wurden zu diesem Zweck 24 Stunden bei 40° im Brutschrank aufbewahrt, um die Restmengen abzdampfen. (Siedepunkt-Äther = 32°). Trotzdem gelang es mit dieser Massnahme nicht, die Seren ätherfrei zu bekommen. In der Kultur zeigte sich eine erhebliche Senkung des Explantatstoffwechsels. (Äther hat eine verhältnismässig hohe Adsorptionsfähigkeit an Wasser, (Bunsen'scher Koeffizient = 15) wodurch die Rückdiffusion in Luft sehr langsam vor sich geht.) Das Verfahren war deshalb unbrauchbar.

Des weiteren wurde versucht, eine Entfettung der Seren durch Verseifung zu erreichen. Der Grundgedanke war, die Lipoide unter Einwirkung von verdünnter Kalilauge in Alkaliseife überzuführen. Die Alkaliseife sollte anschliessend durch entsprechend zugegebenes Calciumchlorid zu Kalkseife umgesetzt werden. Kalkseife ist unlöslich und kann abzentrifugiert

werden. Bei der Ausführung zeigte sich, dass zu hohe KOH-Konzentrationen erforderlich sind, um die Verseifung herbeizuführen. Es gelingt später nicht mehr, im Kulturmedium isotonische Verhältnisse zu schaffen. Die Ursache dürfte in der Pufferwirkung der Serumproteine liegen.

Eichkurve zur quantitativen Albuminbestimmung



Werte:

Photometer-Einheiten	85	100	115	130	145	160	175	190
mg Rinderalb. pro 0,1 ml Lösg.	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0

Eppendorf - Photometer, Filter: 560 mμ

VERSUCHSERGEBNISSE

Es wurde Serum von insgesamt 42 Patienten mit malignen Tumoren untersucht. In 26 Fällen war eine klare Heminwirkung auf den Explantastoffwechsel festzustellen, d.h. bei rund 62 % der Patienten. Es handelte sich hierbei interessanterweise um solche Kranke, die klinisch eine Beschleunigung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) aufwiesen. In den übrigen Fällen, deren Serum keine Wirkung zeigte, wurden normale BKS-Werte angetroffen. In Tabelle 1 ist der Teil der Versuche zusammengefasst, bei dem der depressive Effekt nachweisbar war. Daneben sind die BKS-Werte angegeben. (Bei einigen Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht stationär waren, sind die BKS-Werte unbekannt. Diese Versuche sind am Ende der Tabelle aufgeführt.)

TABELLE 1

Versuch Nr.	BKS- Wert	Alter des Pat.	Geschlecht	Bemerkung zur Art des Tumors	Imp/mg Tumor-Ser. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Ser. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
1	48/79	43	♀	Uterus- Corpus- Carcinom	184,1	238,1	- 22,7 %
2	43/64	74	♂	Rectum- Carcinom	765,4	834,4	- 8,3 %
3	42/82	76	♀	Ileocoecal- Carcinom	238,0	266,5	- 10,7 %
4	30/58	65	♂	Bronchial- Carcinom	188,8	242,8	- 22,3 %
5	92/110	66	♂	Bronchial- Carcinom	188,1	242,8	- 22,6 %
6	18/42	61	♂	Rectum- Carcinom	104,1	164,0	- 36,5 %
7	15/40	73	♂	prim. Leber- Carcinom	733,5	871,4	- 15,9 %
8	27/62	66	o	Bronchial- Carcinom	185,7	243,6	- 23,8 %
9	70/100	71	♀	Uterus-Cor- pus-Carcinom 1 Tag post op.	114,9	146,2	- 21,5 %
10	20/48	69	♀	Ovarial- Carcinom	421,7	488,0	- 13,1 %

Versuch Nr.	BKS- Wert	Alter des Pat.	Geschlecht	Bemerkung zur Art des Tumors	Imp/mg Tumor-Ser. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Ser. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
11	59/87	49	♀	Ovarial- Carcinom	280,8	353,8	- 20,7 %
12	25/52	54	♀	Uterus- Collum- Carcinom	235,2	353,8	- 33,6 %
13	100/137	50	♀	Blasen- Carcinom	139,5	157,1	- 11,3 %
14	90/134	65	♀	Ileocoecal- Carcinom	365,7	394,5	- 7,3 %
15	37/56	54	♀	Uterus- Corpus- Carcinom	424,0	500,0	- 14,9 %
16	60/100	69	♀	Struma maligna	466,4	597,3	- 21,9 %
17	80/105	54	♀	Colon sigma- Carcinom	417,7	454,4	- 8,6 %
18	32/42	31	♀	Uterus- Collum- Carcinom	682,2	761,6	- 10,3 %
19	73/82	62	♀	Ovarial- Carcinom	613,0	761,6	- 19,6 %

Bei den Versuchen Nr. 20 bis Nr. 26 sind die BKS-Werte unbekannt.

Versuch Nr.	BKS- Wert	Alter des Pat.	Geschlecht	Bemerkung zur Art des Tumors	Imp/mg Tumor-Ser. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Ser. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung ‰ von N
20	unbek.	83	♀	Ovarial- Carcinom	301,0	642,0	- 53,0 ‰
21	unbek.	48	♀	5 Tage post op. Mamma-Ca.	477,0	813,5	- 41,4 ‰
22	gleiche Patientin wie in Vers. 21, jedoch 28 Tage post operat.			7 Tage post op.	325,6	395,7	- 17,2 ‰
23	unbek.	58	♂	Bronchial- Carcinom	122,9	164,0	- 25,1 ‰
24	unbek.	79	♂	rezidiv. Lippen- Carcinom	174,7	209,0	- 15,6 ‰
25	unbek.	56	♂	Bronchial- Carcinom	545,3	662,8	- 17,8 ‰
26	unbek.	63	♀	Uterus- Collum- Carcinom	163,3	182,7	- 10,7 ‰

Bei den Versuchen Nr. 27 bis Nr. 30 war keine Depression des Explantatstoffwechsels nachweisbar, obwohl erhöhte BKS-Werte vorlagen

Versuch-Nr.	BKS-Wert	Alter des Pat.	Geschlecht	Bemerkung zur Art des Tumors	Imp/mg Tumor-Ser. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Ser. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
27	39/74	48	♀	Ovarial-Carcinom	465,6	475,8	- 2,2 %
28	15/40	46	♀	Ovarial-Carcinom	193,7	197,5	- 2,0 %
29	25/52	57	♀	Ovarial-Carcinom	210,2	197,5	+ 6,4 %
30	38/62	53	♀	Ovarial-Carcinom	384,7	371,3	+ 3,6 %

Tabelle 2 zeigt Versuche, bei denen das Patientenserum keine nennenswerte Wirkung auf die Explantaktivität hatte. Daneben sind die BKS-Werte ersichtlich.

TABELLE 2

Versuch Nr.	BKS- Wert	Alter des Pat.	Geschlecht	Bemerkung zur Art des Tumors	Imp/mg Tumor-Ser. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Ser. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
31	4/10	69	♂	Magen- Carcinom	257,5	266,5	- 4,4 %
32	2/5	56	♂	Bronchial- Carcinom	209,3	207,0	+ 1,1 %
33	9/20	26	♀	Thekazel- Tumor	254,1	266,2	- 4,6 %
34	4/10	38	♀	Portio- Carcinom	168,0	157,1	+ 6,9 %
35	12/22	71	♀	Portio- Carcinom	462,8	489,1	- 5,5 %
36	6/14	56	♀	Uterus- Adeno- Corpus- Carcinom	500,0	498,8	+ 0,2 %
37	9/24	58	♀	Uterus- Corpus- Carcinom	741,1	761,1	- 2,7 %

Bei den Versuchen Nr. 38 bis Nr. 41 waren die BKS-Werte unbekannt.

Versuch Nr.	BKS-Wert	Alter des Pat.	Geschlecht	Bemerkung zur Art des Tumors	Imp/mg Tumor-Ser. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Ser. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
Uterus-							
Corpus-							
38	unbek.	59	♀	Carcinom 1 Jahr post operativ rezidivfrei	505,4	511,9	- 1,3 %
39	unbek.	80	♂	Lippen- Carcinom	166,7	164,0	+ 1,5 %
Magen-							
Carcinom							
40	unbek.	64	♂	1 Jahr post operativ rezidivfrei	885,1	871,4	+ 1,5 %
Polymorph-							
zelliges							
41	unbek.	51	♀	Sarkomrezi- div des Para- metriums	188,4	182,7	+ 3,1 %

Versuch 42 erbrachte bei normalen BKS-Werten eine Depression von $\approx 12\%$.

42	3/6	46	♀	Ovarial- Carcinom	545,5	620,0	- 12,1 %
----	-----	----	---	----------------------	-------	-------	----------

DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Aus den beiden Tabellen geht hervor, dass bei BKS-Werten über 10/20 in den Seren hemmende Faktoren wirksam werden. (Eine proportionale Beziehung scheint jedoch nicht zu bestehen. Die Gründe hierfür werden unten diskutiert.)

Obwohl in mehreren Fällen die BKS-Werte nicht bekannt sind, ergibt eine diesbezüglich angestellte Signifikanzberechnung positive Resultate:

Betrachtet werden 23 Versuche mit erhöhter BKS aus Tabelle 1 gegen 8 Versuche mit normaler BKS aus Tabelle 2.

Für jede Gruppe wird zunächst der mittlere Fehler (s) nach der Formel von Gauss bestimmt. Hierzu werden die einzelnen Ergebnisse als Abweichungen von 100 (= Wert der Kontrollen) ausgedrückt.

Für die erste Gruppe ergaben sich folgende Werte:

Versuch Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8
Werte (n)	77,3	91,7	89,3	77,7	77,4	63,5	84,1	76,2
9	10	11	12	13	14	15	16	17
78,5	86,9	79,3	66,4	88,7	92,7	85,1	78,1	91,4
18	19	20	21	22	23	24	25	26
89,7	80,4	97,8	98,0	106,4	103,6			

Arithmetisches Mittel (m_1) = 85,2

Berechnung des mittleren Fehlers (s_1):

$$s_1 = \pm \sqrt{\frac{(m_1 - n_1)^2 + (m_1 - n_2)^2 + (m_1 - n_3)^2 \dots + (m_1 - n_{23})^2}{n - 1}}$$

$$s_1 = \pm \sqrt{\frac{2542}{22}}; \quad s_1 = \pm \sqrt{115,5}$$

Verwendete Werte der Gruppe 2 (aus Tabelle 2):

Versuch Nr.:	31	32	33	34	35	36	37	42
Werte (n)	95,6	101,1	95,4	106,9	94,5	100,2	97,3	87,9

Arithmetisches Mittel (m_2): 97,3

Mittlerer Fehler s_2

$$s_2 = \pm \sqrt{\frac{(1,7)^2 + (3,8)^2 + (1,9)^2 + (9,6)^2 + (2,8)^2 + (2,9)^2 + (9,4)^2}{7}}$$

$$s_2 = \pm \sqrt{\frac{217,7}{7}}; \quad s_2 = \pm \sqrt{31,1}$$

Die beiden mittleren Fehler (s_1, s_2) werden nach Division durch die Anzahl der Werte zu $\bar{s}$ zusammengefasst:

$$\bar{s}^2 = \frac{s_1^2}{(n)_1} + \frac{s_2^2}{(n)_2} \quad \bar{s}^2 = \frac{115,5}{23} + \frac{31,1}{8}$$

$$\bar{s} = \pm \sqrt{8,9} = \underline{2,98}$$

Es gilt: Ist die Differenz der arithmetischen Mittelwerte grösser als $2,58 \bar{s}$, so besteht eine Signifikanz von 99 Prozent:

$$m_2 - m_1 = > 2,58 \bar{s}$$

$$97,3 - 85,2 > 2,58 \cdot 2,98$$

$$\underline{12,1} > 7,68$$

Bei Anstieg der BKS verursacht das Serum der Tumor-Patienten eine signifikante Hemmung des Explantatstoffwechsels.

Das Vorliegen einer Blutkörperchensenkungsbeschleunigung ist Ausdruck einer Verschiebung des Albumin-Globulin-Verhältnisses im Serum. Die Erythrocyten sedimentieren um so rascher, je geringer die negativ-elektrische Ladung ihrer Eiweisschüllen ist. Diese wiederum hängt weitgehend von der Art und Konzentration der anderen Ladungsträger innerhalb des Blutplasmas ab, vor allem von den Serumproteinen. Da die Serumglobuline schwächer elektrisch negativ sind als die Albumine, deutet eine Erhöhung der BKS-Werte die Vermehrung der Globulinfractionen an.

Ob die unspezifische Zunahme der Globuline im Serum der Carcinom-Träger die unmittelbare Ursache der Stoffwechseldepressionen ist, lässt sich damit noch nicht sagen. Eine tumorgebundene Hemmwirkung ist nicht ausschliessbar. Die klinische Erfahrung zeigt, dass bei Patienten mit normalen BKS-Werten Geschwülste des Anfangsstadiums vorliegen, in dem der Tumor noch klein und meist gut von der Umgebung abgrenzbar ist. Es ist denkbar, dass hier, infolge der zu geringen Grösse des Tumors eine von ihm induzierte spezifische Hemmwirkung dem Nachweis entgeht. Ein messbarer Einfluss wäre dann erst in

fortgeschrittenen Fällen zu erwarten. Obwohl in späteren Stadien die BKS-Werte bei rund 95 % der Patienten erhöht sind (K. H. BAUER) brauchen also die beiden Erscheinungen in keinem inneren Zusammenhang zu stehen.

Anhand der Arbeiten von WRBA und RABES lassen sich über die möglichen Hintergründe des hemmenden Faktors im Serum der Tumor-Ratte einige Überlegungen anstellen: "Der grosse Bedarf eines wachsenden Tumors an nutritiven Substanzen legt den Gedanken nahe, dass das Serum des Wirtsorganismus an diesen Stoffen verarmt und in der Kultur deshalb eine geringere nutritive Wirkung entfaltet als normales Rattenserum. Da die Glukose im Tumorstoffwechsel eine zentrale Stellung einnimmt, prüften wir, ob der Hemmeffekt des Serums krebskranker Tiere auf Glukosemangel zurückzuführen und durch Zusatz eines Überschusses an Glukose aufzuheben oder abzuschwächen ist. Wir fanden, dass auch ein Glukosezusatz von 300 mg% die Wirkung des Tumortier-Serums nicht verändert." (zit. WRBA und RABES) (5).

Weiter ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, dass der Serum-ei-weiss-Spiegel tumortragender Individuen häufig erniedrigt ist. Bei den Untersuchungen von WRBA und RABES enthielten die Kulturmedien Zusätze von Embryonalextrakt (15 %), also nutritiv sehr wirksame Eiweissstoffe. Aus diesem Grund entfiel hier die Frage, ob eine mangelhafte Versorgung der Organexplantate mit Proteinen für den Effekt verantwortlich sein könnte. In den vorliegenden Versuchen mit menschlichen Seren wurde jedoch kein Embryonalextrakt verwandt. Es war deshalb zu klären, wie sich unterschiedliche Konzentrationen von Serumprotein in den Medien auf den Explantatstoffwechsel auswirken. Hierzu wurden gleichartige Kulturansätze mit Anteilen von normalem Spender-serum nach steigender Menge gestaffelt und in ihren Aktivitäten verglichen (siehe Abb. 2). Es ergab sich ein Maximum der Phosphataufnahme bei 15 %. Weitere Erhöhung des Serumanteils führt zu einem Rückgang der Explantataktivität. Bei 30 % wird das Niveau der nutritiven Wirkung reiner Hank'scher Lösung unterschritten. (Diese zunehmende Blockierung macht sich auch bei Überkonzentration anderer Kulturnährstoffe (TCM, Embryonalextrakt) bemerkbar. Es handelt sich also um keine spezielle Serumeigenschaft.)

Im Ganzen gesehen ist die stoffwechselsteigernde Wirkung der Serumproteine in der Gewebekultur relativ gering. Selbst bei optimaler Konzentration steigern sie die Phosphataktivität gegenüber der Züchtung in reinem Hanks-Medium nur um rund 1/10.

Bei den Versuchen mit Serum von Carcinom-Patienten lagen die zugesetzten Serummengen bei 33 %. In diesem Bereich ist keine Aktivitätsdepression durch verminderten Eiweissgehalt zu erwarten. Der Hemmeffekt ist demnach mit einer Hypoproteinämie nicht erklärbar. Er scheint nicht vom Angebot an Substrat abhängig zu sein, sondern von einer primären Störung der Substratverwertung in den Zellen.

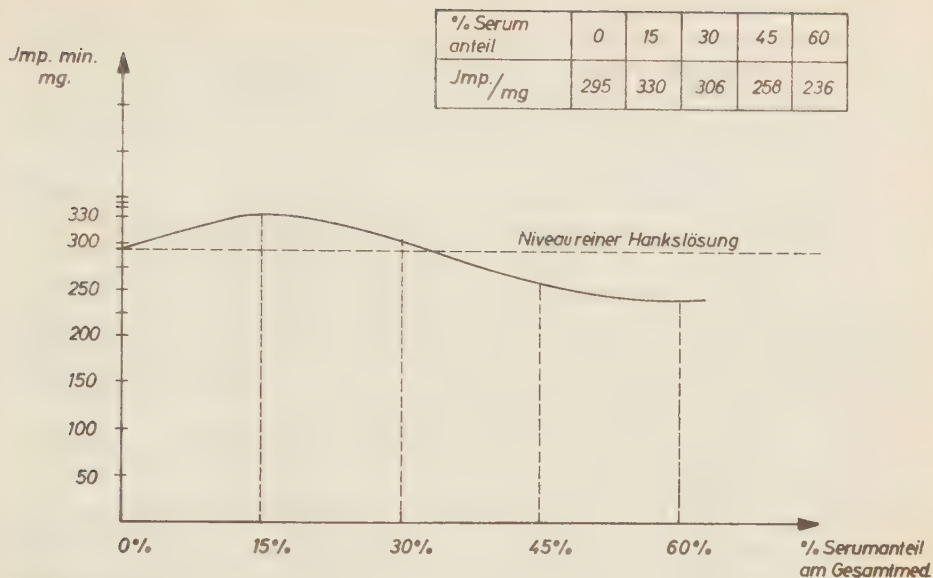


ABBILDUNG 2

Damit stellt sich die Frage nach cytotoxischen Faktoren. Die Existenz spezifischer Toxine im Blut der Tumorkranken wird heute von den meisten Autoren verneint. Wegen der typischen Allgemeinerscheinungen (Gewichtsverlust, Anämie), die bei manchen malignen Blastomen schon in frühesten Entwicklungsstadien auffällig sind, werden jedoch immer wieder solche Stoffe in Betracht gezogen.

Die Art der vorliegenden Untersuchungsmethodik gestattet keine grundsätzliche Entscheidung darüber, ob der beobachtete Hemmeffekt auf quantitativen oder qualitativen Unterschieden zwischen Tumors Serum und Normalserum beruht, d.h.: ob er durch mengenmässige Verschiebungen normalerweise vorhandener Hemmstoffe oder durch ein krebsspezifisches Toxin zustande kommt. Die Vielfalt der Bestandteile nativen Serums lässt beide Möglichkeiten offen.

Dem tatsächlichen Sachverhalt könnte man näherkommen, wenn es gelänge, die verwendeten Seren in ihrer Zusammensetzung exakt zu definieren. Dies ist praktisch undurchführbar. Es lässt sich aber daran denken, das Serum elektrophoretisch in seine genauer objektivierbaren Proteinfractionen zu zerlegen und diese einzeln auf ihre Wirkung in der Gewebekultur zu untersuchen. Dieser Gedanke hat einige Berechtigung, wenn man von der Annahme ausgeht, dass es sich bei dem vermuteten spezifischen Toxin um ein Molekül von Proteinatur handelt. Die Albumine stellen mit einem Anteil von ca. 60% die grösste Einzelfraktion innerhalb des Serumgesamteweisses dar. Es liegt nahe,

hier zuerst nach dem Auftreten des Faktors zu suchen.

Die genannten Gründe bewogen dazu, im Rahmen der vorliegenden Arbeit den Versuch zu machen, quantitativ definierte Albuminfraktionen aus Tumorsерum und Spenderserum abzuspalten und in der Gewebekultur zu vergleichen. (Die Verfahrensweise zur Gewinnung geeigneter Albuminlösungen siehe im Abschnitt MATERIAL UND METHODE.)

Tabelle 3 gibt die Werte von 3 Versuchen wieder, die mit den Albuminfraktionen aus Tumorsерum und Spenderserum durchgeführt wurden.

Die Untersuchung der Albuminfraktion des Tumorsерums ergab keinen Anhalt für einen enthaltenen Hemmfaktor. Stoffwechseldepressionen, wie sie in den Versuchen mit Vollserum beobachtet wurden, liessen sich nicht reproduzieren. Die gemessenen Abweichungen in der Phosphataktivität sind unerheblich. Ein tumorspezifischer Hemmkörper, der mit der Albuminfraktion isolierbar wäre, scheint demnach nicht vorzuliegen.

Die stoffwechselsekende Wirkung des Tumorsерums muss aus anderen Ursachen erklärt werden.

Mit grosser Wahrscheinlichkeit treten bei fortgeschrittener Ausbreitung eines Tumors Hemmstoffe unspezifischer Natur im Serum auf. Es sind Nekrosetoffe, die bei partiellem Untergang und Abbau von Tumorgewebe entstehen. Diese Substanzen sind vermutlich auch für die Ausbildung der finalen Kachexie der Kranken verantwortlich zu machen. Von MENKIN (6) wurden aus geschädigten Geweben mehrere Polypeptide isoliert, die eine starke biologische Aktivität aufweisen. Einige davon wirken lokal entzündungsauslösend (Leukotaxin, Exsudin, Pyrexin), ein anderes hat die Eigenschaft, auf gesunde Zellen toxisch zu wirken (Nekrosin).

Nach CASPARI (7) werden aus zugrunde gegangenen Geschwulstzellen sogenannter "Nekrohormone" frei, die zu einer unspezifischen Reizung des reticulo-endothelialen Systems führen. Globulinvermehrung und BKS-Beschleunigung sind demnach als Reaktion des Organismus auf solche Zerfallsprodukte aufzufassen.

Die Vermutung liegt nahe, dass die Nekrosetoffe für den Hemmeffekt in der Gewebekultur unmittelbar verantwortlich sind. Dagegen jedoch sprechen die Ergebnisse der Versuche Nr. 9, 20, 21 und 22 aus Tabelle 1: Nach radikaler operativer Entfernung waren die Tumoren nach Tagen bis Wochen ein hemmender Einfluss des Serums der betreffenden Patienten feststellbar.

Weitere Versuche trugen dazu bei, die Frage zu entscheiden, ob die Hemmwirkung von Nekrosetoffen hervorgerufen wird, oder ob sie als Ausdruck einer Dysproteinämie an sich zu werten ist: Es wurde Serum von Patienten untersucht, bei welchen eine entzündlich-infektiös verursachte BKS-Erhöhung vorlag. Klinisch handelte es sich dabei um lokale entzündliche Prozesse im Bereich der weiblichen Genitalien mit teilweise stark erhöhten BKS-Werten:

TABELLE 3

Versuch Nr.	BKS- Wert	Alter des Pat.	Bemerkung zur Art des Tumors	Zugesetzte Alb.-Menge (mg)	Imp/mg Tumor-Alb. (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Alb. (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
43	48/82	68	Uterus- Corpus- Carcinom	32	831,0	795,5	+ 4,3 %
44	33/49	60	Cystadeno- Carcinom des Ovars	25	885,9	939,9	- 5,8 %
45	35/54	37	Uterus- Collum- Carcinom	28	591,1	568,3	+ 3,9 %

(Es wäre wünschenswert gewesen, daneben in parallelen Versuchen jeweils auch das Vollserum des betreffenden Patienten zu untersuchen. Wegen der begrenzten Menge an verfügbarem Patientenserum - das zur Isolierung genügend hoch konzentrierter Albuminlösungen knapp ausreichte - musste hierauf verzichtet werden.)

TABELLE 4

Versuch Nr.	BKS- Wert	Bemerkung zur Art der Entzündung	Imp/mg Entzündungs-Serum (Mittelwert)	Imp/mg Normal-Serum (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
46	41/58	entzündliche Verwachsungen des Parametriums	368,1	454,4	- 19 %
47	56/108	Endometritis	166,9	182,7	- 8,7 %
48	38/75	rechts- und links- seitig Adnexitis	536,6	602,2	- 12,3 %
49	54/85	Adnexitis	491,3	602,2	- 18,1 %
50	61/120	entzündlicher Adenxtumor	567,1	646,5	- 12,3 %
51	90/160	Abortus imminens	491,8	571,4	- 14 %
52	51/76	Abortus imminens	150,1	303,8	- 50,6 %
53	53/94	klimakterische Metrorrhagie	241,3	303,8	- 20,6 %
54	45/95	Adnexitis	213,9	334,9	- 36,2 %
55	45/90	Adnexitis	256,8	334,9	- 23,4 %

Tabelle 4 zeigt, dass das Serum von Patienten mit einer Sekungsbeschleunigung auf entzündlicher Grundlage ebenfalls den Explantatstoffwechsel hemmt. Der Hemmfaktor ist also nicht an das Serum von Tumor-Patienten gebunden. Die Hemmwirkung von Nekrosetoffen kann somit als unmittelbare Ursache ausgeschlossen werden. (Diese Feststellung ist allerdings insofern einzuschränken, als Entzündungen, die mit stärkerer Gewebeschädigung einhergehen, ebenfalls zu Nekrosen führen. Ein Einfluss von Zerfallsprodukten wäre also auch hier vorstellbar. Bei der Art der vorliegenden Entzündungen darf jedoch angenommen werden, dass hierbei die Einschwemmung solcher Stoffe in die Blutbahn wesentlich weniger intensiv ist, als bei nekrotisch zerfallenden Tumoren. Eine ausschlaggebende Wirkung auf den Explantatstoffwechsel von dieser Seite ist unwahrscheinlich. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Versuche Nr. 51 und 52 aus Tabelle 4 unterstrichen. Sie zeigen, dass das Auftreten des Hemmeffektes von nekrotisierenden Vorgängen unabhängig ist. In beiden Fällen wurden beachtliche Aktivitätsdepressionen beobachtet, obwohl kein entzündlicher Prozess vorlag. Die BKS-Erhöhen bei diesen Patientinnen beruhen auf Gravidität.)

Der BKS-Erhöhen, bzw. der damit verbundenen Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten, scheint in vitro die entscheidende Bedeutung zuzukommen. Das Gewicht ist hierbei auf die Zunahme der Globulinfractionen zu legen. (Die gleichzeitige Verringerung der Albumine könnte nur in nutritiver Hinsicht eine Rolle spielen und kommt auf Grund obiger Untersuchung nicht in Betracht.)

Der γ -Globulinanteil am Serumgesamteiweiß beträgt beim Gesunden durchschnittlich 17 %. Bei pathologischen Zuständen kann er sich um das zwei- bis dreifache erhöhen. Neben spezifischen Antikörpern handelt es sich dabei hauptsächlich um polyvalente Eiweißstoffe (Properdin-System). Es ist durchaus möglich, dass solche Substanzen an den Zellen der Gewebekultur angreifen und deren Stoffaustausch stören.

Ein anderer Aspekt ist, dass für den Ausfall der BKS-Reaktion nicht allein quantitative Veränderungen der Proteinfractionen in Frage kommen. Die Sekungsbeschleunigung kann auch von Faktoren abhängen, die normalerweise im Serum völlig fehlen. Beispielsweise treten in Gegenwart atypischer Eiweißkörper sogenannte "Sturzsenkungen" auf (Plasmocytom: Werte über 100 in der ersten Stunde).

Neuere Arbeiten über die Zusammenhänge zwischen BKS und Bluteiweißzusammensetzung diskutieren spezifische, hochmolekulare Proteine, deren Anwesenheit für eine Sekungsbeschleunigung Vorbedingung ist. Nach FRIMBERGER (8) setzen sich die "Geline" auf der Oberfläche der Erythrocyten fest und bilden dort eine Art Haftschrift. Dadurch werden die Abstossungskräfte zwischen den Erythrocyten beseitigt und es kommt zur Sedimentierung.

Von RUHENSTROTH-BAUER werden die "Agglomerine" beschrieben (9). Es werden zwei Faktoren unterschieden, die zusammenwirken müssen, um eine BKS-Beschleunigung hervorzurufen. Der eine Faktor (S) kommt auch beim Gesunden vor, während der andere Faktor (A) auf Patienten mit hoher Senkung beschränkt ist. Mittels einer Komplementreaktion und gewisser Rezeptoren verbinden sich die Agglomerine mit den Erythrocyten-Membranen und führen eine Agglutination herbei. Bemerkenswert ist, dass diese Faktoren keine Fibrinogenbestandteile sind, die nur im Blutplasma vorkämen. Ihre Wirksamkeit konnte auch im Serum nachgewiesen werden.

Die offensichtliche Affinität zu Zellmembranen lässt daran denken, dass derartige Substanzen in ähnlicher Weise die Oberfläche der Kulturzellen blockieren und so den Hemmeffekt auslösen könnten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass wahrscheinlich strukturelle Besonderheiten der Globulinfraktionen des Patientenserums für dessen Stoffwechselwirksamkeit *in vitro* verantwortlich sind.

Es lässt sich folgern, dass der Hemmfaktor an die Unversehrtheit der Serumproteine gebunden ist: Ein Eingriff in die nativen Proteinstrukturen muss ihn demnach zum Verschwinden bringen.

Um dies nachzuprüfen, wurden Patientenserum untersucht, dessen Eiweissanteil vorher denaturiert worden war. (Das praktische Vorgehen wurde im Abschnitt MATERIAL UND METHODE beschrieben.) (Siehe Tabelle 5).

Sieht man von der pathologisch veränderten Proteinzusammensetzung in den untersuchten Seren ab, so bleiben noch einige Faktoren zu diskutieren, die ebenfalls für eine Wirkung auf den Explantatstoffwechsel in Betracht kommen. Hier lässt sich anführen, dass in der Mehrzahl der durchgeführten Versuche Patient und gesunder Spender verschiedenen Altersgruppen angehörten. Dies wird vor allem aus den Tabellen 1 und 2 deutlich; Das Durchschnittsalter der Carcinom-Patienten lag bei 60 Jahren, während die gegenübergestellten Normal-Serumspender 20-30 Jahre alt waren. Über eine Abhängigkeit der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit vom Lebensalter, die in diesem Zusammenhang interessant wäre, ist nichts bekannt. Auch im hohen Alter braucht sie nicht gesetzmässig beschleunigt zu sein (BEGEMANN) (10). Die in der Praxis häufig beobachtete BKS-Beschleunigung bei alten Menschen hat ihre Ursache meist in altersbedingten Komplikationen (chronische Bronchitiden, rheumatische Affektionen usw.). Es wäre vorstellbar, dass unbekannte, altersgebundene Faktoren des Patientenserums den Hemmeffekt ausgelöst haben. Möglicherweise ändert sich mit zunehmendem Alter die Nährbodeneignung des Serums. Unterschiede lassen sich auch in Bezug auf den Hormonhaushalt, oder in Änderungen des Eiweissstoffwechsels denken. (Nach THEIMER ist der Gehalt an freien Aminosäuren im Serum von Greisen gegenüber dem Serum von Jugendlichen verschoben (11)).

Aus diesen Gründen war es von Bedeutung, festzustellen, ob ein grösserer Alters-

TABELLE 5

Versuch Nr.	BKS- Wert	Beinerkung zur Art der Erkrankung	Imp/mg denaturiertes Patienten- Serum (Mittelwert)	Imp/mg denaturiertes Normal- Serum (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
56	27/53	Larynx- Carcinom	586,4	591,6	- 0,9 %
57	19/39	Rectum- Carcinom	599,4	591,6	+ 1,4 %
58	22/54	Bronchial- Carcinom	290,8	283,4	+ 2,6 %
59	36/67	Cavernöse Lungen-Tbc.	298,0	284,4	+ 4,9 %

Es ist ersichtlich, dass nach Denaturierung kein Hemmeffekt des Patienten-Serums mehr festzustellen ist. Die gemessenen Abweichungen liegen innerhalb der Fehlerbreite.

Die aktive Wirkung gewisser Proteine auf den Explantatstoffwechsel scheint durch die Denaturierung aufgehoben zu werden.

unterschied zwischen den Serumspendern den Explantatstoffwechsel abweichend beeinflusst.

Es wurden Serumproben von 5 männlichen Greisen (Alter über 80 Jahre) mit dem Serum eines 25-Jährigen verglichen. (Siehe Tabelle 6, Seite 29).

TABELLE 6

Versuch Nr.	Alter	Imp/mg Greisen-Serum (Mittelwert)	Imp/mg Serum des 25-Jährigen (Mittelwert)	Aktivität Abweichung % von N
60	93	340,5	349,4	- 2,6 %
61	90	349,8	349,4	+ 0,1 %
62	82	324,4	349,4	- 7,2 %
63	86	327,9	349,4	- 6,2 %
64	87	353,7	349,4	+ 1,2 %

Tabelle 6 zeigt, dass die Aktivitätsabweichungen der Greiseneren innerhalb der Fehlergrenze (8 %) streuen. Die stärkste Depression gegenüber dem Serum des 25-Jährigen beträgt 7,2 %. Ein spezieller Altersfaktor mit nennenswerter Wirkung auf die Kulturzellen darf demnach ausgeschlossen werden.

Als weiterer wichtiger Gesichtspunkt für die Untersuchung von Serumeigenschaften in der Gewebekultur sind Einflüsse zu erörtern, die aus den Verschiedenheiten der menschlichen Ernährungsweise resultieren. So ist beispielsweise die Konzentration an Fetten und Lipoiden im Serum von Fall zu Fall grossen Schwankungen unterworfen. Nach REIN-SCHNEIDER bewegt sich der Gehalt an Neutralfetten zwischen Null und 450 mg%.

Inwieweit ein unterschiedlicher Lipoidgehalt der Seren auf die Explantataktivität einwirkt, wurden in den folgenden Versuchen geprüft (Tabelle 7). Lipäisches Serum (milchig getrübt) und Nüchternserum, entnommen von gesunden Spendern, wurden einander gegenübergestellt.

TABELLE 7

Versuch Nr.	Imp/mg lipäisches Serum (Mittelwert)	Imp/mg Nüchtern-Serum (Mittelwert)	Aktivitäts- Abweichung in % von Nüchtern-Serum
65	400,0	464,1	- 13,8 %
66	305,5	362,3	- 15,7 %
67	407,2	471,1	- 13,6 %
68	372,5	423,3	- 12,1 %
+69	1001,4	1137,3	- 12,0 %

+ Um individuell bedingte Schwankungen zwischen den verschiedenen Spendern auszuschalten, wurden im Versuch 69 sowohl das lipäische, als auch das Nüchtern-Serum von der gleichen Person abgenommen.

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass das lipäische Serum gegenüber Nüchtern-Serum die Stoffwechselaktivität senkt.

Hieraus ergibt sich allgemein für Untersuchungen von pathologischen Seren in der Gewebekultur ein Problem. Um die Nebeneinflüsse von Seiten der Serumlipide niedrig zu halten, muss dafür Sorge getraffen werden, dass der Fettgehalt der jeweils verglichenen Seren möglichst gering ist. Es ist also Wert auf Nüchtern-Serum zu legen. Doch auch im Nüchtern-Serum ist die Lipidkonzentration bei Patient und gesundem Spender meist unterschiedlich. Die Nahrungsaufnahme ist oft bei den Patienten, besonders den Tumorkranken, deutlich herabgesetzt. Man beobachtet deshalb im Nüchtern-Serum des Patienten im allgemeinen eine stärkere Verarmung an Fettstoffen als im Nüchtern-Serum des Gesunden.

Bezogen auf die Wirkung in der Gewebekultur bedeutet das, dass Normalserum einen eigenen -wenngleich geringeren- hemmenden Einfluss auf den Explantatstoffwechsel geltend macht. Die Ergebnisse der Versuche mit pathologischen

Seren werden sich demnach aus zwei Faktoren bestimmen, die sich gegenseitig überlagern (12). Hierin ist die Erklärung für die Ungleichmässigkeit der gemessenen Stoffwechseldepressionen zu suchen. Nachdem der Hemmeffekt des Patienten-Serums gemeinsam mit einer BKS-Beschleunigung auftritt, also von Stoffen hervorgerufen erscheint, die auch den Ausfall der BKS-Reaktion bedingen, wäre ein proportionales Verhältnis zwischen diesen beiden Erscheinungen zu erwarten. Wie Tabelle 1 und Tabelle 4 zeigen, war dies nicht immer der Fall. Auf Grund der Lipoidnebenwirkungen ergaben sich bei Serum von Patienten mit hohen BKS-Werten oftmals nur geringe Stoffwechselhemmungen und umgekehrt. Es lag nahe, den Versuch zu machen, die Lipide aus den Seren zu entfernen. Dies stiess jedoch in der Praxis auf Schwierigkeiten. (Über die angewandten Verfahrensweisen siehe bei MATERIAL UND METHODE.)

Alle Versuche, die Lipide mit Reagenzien aus dem Serum zu entfernen, sind im Hinblick auf spätere Untersuchungen in der Gewebekultur problematisch. Jeder Zusatz reaktionsfähiger Verbindungen lässt unkontrollierbare Strukturveränderungen der Serumproteine befürchten.

Die Lipide liegen im Serum zum Teil an hochmolekulare Eiweisskörper gebunden vor. Man kann diese Lipoproteide in der Zentrifuge abtrennen. Damit werden jedoch einerseits nicht alle Lipide erfasst, andererseits wird durch diese Massnahme in die Zusammensetzung der Eiweisskomponenten der verglichenen Seren eingegriffen.

Im Gegensatz zum Tierversuch, wo sich durch geregelte Nahrungszufuhr eine weitgehende Konstanz der Serumbestandteile erreichen lässt, scheint man bei Untersuchungen an menschlichen Seren die grössere Schwankungsbreite der Messergebnisse in Kauf nehmen zu müssen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde geprüft, ob Serum von unbehandelten Carcinom-Patienten gegenüber dem Serum Gesunder eine Abweichung der Stoffwechselaktivität von Organkulturen in vitro bewirkt. Die Untersuchungsmethode beruht auf der Bestimmung des Einbaues von radioaktiv markiertem, anorganischem Phosphat in die Zellen. Unter 42 Fällen wurde in 62 % eine signifikante Hemmwirkung des Blutserums Krebskranker festgestellt.

Die Untersuchung der Wirkung aus dem Blutserum Krebskranker isolierter Albuminfraktionen brachte kein Ergebnis.

Ein Anhaltspunkt für das Vorliegen eines krebsspezifischen cytotoxischen Faktors ergab sich nicht.

Es wurde eine Beziehung der Hemmwirkung zur klinischen Erhöhung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit beobachtet. Bei gleichzeitig vorhandener BKS-Beschleunigung verursachte das Tumors Serum in 83 %, bei normalen BKS-Werten nur in 12 % der Fälle einen Hemmeffekt.

Nachdem erhöhte BKS-Werte auf eine Verschiebung in den Serumeiweissfraktionen hinweisen, ist anzunehmen, dass insbesondere der γ -Globulinvermehrung ursächliche Bedeutung zukommt.

In weiteren Versuchen mit Serum von Patienten mit entzündlich- bzw. infektiös bedingter Senkungsbeschleunigung liess sich der Zusammenhang bestätigen. Auch hier zeigte sich die Hemmwirkung. Sie verschwand nach Denaturierung des Serumproteins mit absolutem Alkohol. Hieraus wird gefolgert, dass strukturelle Besonderheiten gewisser Eiweisskörper im Patienten-Serum den Stoffaustausch der Kulturzellen aktiv zu stören vermögen.

Die gemessenen Stoffwechseldepressionen streuten zwischen 8 % und 53 %. Ein proportionales Verhältnis zur Höhe der BKS-Werte liess sich nicht feststellen. Dies wird durch den unterschiedlichen Lipoidgehalt in den Seren erklärt. Es zeigt sich, dass Fettstoffe als Nebenfaktoren eine Depressionswirkung auf den Kulturstoffwechsel ausüben.

Von Seiten des Alters der Patienten war kein Einfluss auf die Stoffwechselaktivität vorhanden.

LITERATURVERZEICHNIS

- BAUER K.H.: Das Krebsproblem. (1962)
- WRBA H. u. H.RABES:
Zur Bedeutung der Hemmwirkung von Blutserum tumortragender Tiere auf Organkulturen.
Klin.Wochenschrift 39, 3 II (1961)
- WRBA H. u. H.RABES:
Zur Hemmwirkung von Blutserum tumortragender Ratten.
Klin.Wochenschrift 39, 762 (1961)
- WRPA H.: Vitalitätsbestimmung durch Aufnahme und Umsatz markierter Verbindungen.
Z.Zellforschung 53, 90-140 (1960)
- WRBA H. u. H.RABES:
Die spezifische Wirkung von Seren tumortragender Tiere auf wachsende Organe.
Verh.Ges.Path.45, 158 (1961)
- MEVKIN, V.: Internat.Arch.Allergy 4, 131 (1953)
- CASPARI W.: Zschr.Krebsforschung 19, 74 (1923)
- FRIMBERGER F.: Dtsch.Arch.Klin.Med.206, 82 (1959)
- RUHENSTROTH-BAUER G.:
Blut 5, 91 (1959)
- BEGEMANN H. u. H.G.HARWERTH:
Praktische Hämatologie. (1961)
- THEIMER F.: Physiolog.-chem.Diss.München (1964)
- WRBA H., H.RABES, K.F.MERKER, A.GEIPPEL:
Zur Frage der Hemmwirkung von Blutserum tumortragender Individuen.
Dtsch.Med.Forschung Nr.3, 90 (1963)

An dieser Stelle möchte ich besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Heinrich Wrba für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit danken.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 8. Juli 1938 in Halle/Saale als Sohn des Diplom-
ingenieurs Karl Merker und seiner Ehefrau Rosmarie geboren. In
München besuchte ich die Gisela-Oberrealschule und legte dort, im
Sommer 1957, die Reifeprüfung ab. Es folgte eine 12-monatige Mi-
litärdienstzeit. Zum Wintersemester 1958/59 immatrikulierte ich
mich an der Universität München zum Studium der Medizin. Die
Ärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1961, die Ärztliche
Staatsprüfung im Februar 1965. Gegenwärtig bin ich als Medizinal-
assistent am Institut für experimentelle Pathologie (Deutsches Krebs-
forschungszentrum) in Heidelberg tätig.

